

09/341894



3

REC'D 02 MAR 1998

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 JAN. 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis. rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE**

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **20 JAN 1997**N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **97 00540 -**DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**DATE DE DÉPÔT **20.1.97****1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE****BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS****2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle**☒ brevet d'invention☐ demande divisionnaire☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

F17B11bFR**01.47.03.67.77**

date

Établissement du rapport de recherche☐ différé☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☐ non**Titre de l'invention (200 caractères maximum)****MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN MAMMIFERE PAR TRANSFERT DE GENE D'ANTICORPS
ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONCERNANT.****3 DEMANDEUR (S)**

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS-

Forme juridique

Nationalité (s)

FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

**3, rue Michel Ange
75015 PARIS**

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs☐ oui☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES☐ requise pour la 1^{re} fois☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission**6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

**Marc MAJEROWICZ
960703**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

81

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9700540

TITRE DE L'INVENTION :

**MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN MAMMIFERE PAR LE TRANSFERT
DE GENE D'ANTICORPS ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT.**

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

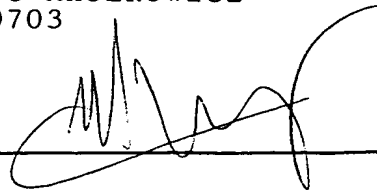
PIECHACZYK Marc
123, rue des Erables
34980 St GELY DU FESC

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 20 Janvier 1997

Marc MAJEROWICZ
960703



MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN
MAMMIFÈRE PAR TRANSFERT DE GÈNE D'ANTICORPS ET
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT.

5 La présente invention concerne le domaine de
la thérapie génique consistant à transférer dans les
cellules d'un sujet au moins un gène codant pour une
protéine thérapeutique. Plus particulièrement,
10 l'invention concerne le transfert, dans des cellules ne
produisant pas naturellement des anticorps, de séquences
d'acide nucléique codant pour tout ou partie ou dérivé
d'anticorps thérapeutiques impliquant une composante
protéique participant à l'effet thérapeutique, de sorte
15 que les cellules génétiquement modifiées par ces
séquences d'acide nucléique et implantées chez un sujet
produisent et sécrètent dans la circulation sanguine
dudit sujet une quantité thérapeutiquement efficace de
cet anticorps.

20 La thérapie génique consiste à corriger la
déficience d'un gène en introduisant, dans les cellules
où la déficience dudit gène est cause d'une pathologie,
une séquence d'ADN portant l'information génétique
permettant de remédier la déficiente. Les perspectives
25 d'application de la thérapie génique dans le domaine des
maladies génétiques sont nombreuses et l'on peut citer
par exemple les corrections des thalassémies, de la
drépanocytose, des déficits du métabolisme hépatique, de
la mucoviscidose, des myopathies, etc ... (W. F.
Anderson, 256, 808, 1992 ; R. C. Mulligan, Science,
30 260, 926, 1993 ; D. Miller, Nature, 357, 455, 1992 ; R.
Morgan et W. F. Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62, 191,
1993 ; B. Dodet, Biofutur, Mai 1992).

35 Mais la thérapie génique permet aussi de
lutter contre des maladies qui ne relèvent pas
exclusivement d'une déficience génétique, tels que des

cancers ou des infections virales, en introduisant dans les cellules de l'organe ou du tissu atteint un gène codant pour une protéine ou un ARN thérapeutique. De telles substances thérapeutiques sont par exemple des cytokines, des anticorps intracellulaire, des variants de protéines virales, des ARNs antisens, des ribozymes, etc

Les techniques permettant l'introduction de l'information génétique dans des cellules sont décrites dans la littérature. Deux approches principales peuvent cependant être envisagées.

La première consistant à introduire la séquence d'ADN portant l'information génétique directement *in vivo* dans les cellules des organes ou tissus cibles de la thérapie ou dans des cellules d'organes ou de tissus chargés de produire la substance thérapeutique, soit au voisinage du lieu de production, soit de façon systémique.

La seconde, relevant de la thérapie cellulaire et dite *ex vivo*, consiste à prélever des cellules d'un sujet, à modifier ces cellules *in vitro* en y introduisant la séquence d'ADN portant l'information génétique que l'on souhaite transférer, puis à réintroduire les cellules ainsi modifiées dans l'organisme du sujet. Cette stratégie thérapeutique est par exemple décrite dans le brevet américain No. 5 399 346.

Les séquences d'ADN portant l'information génétique que l'on souhaite introduire dans les cellules sont associés fonctionnellement à des séquences d'ADN permettant leur expression *in vivo* et peuvent se présenter sous plusieurs formes :

- Dans le cas d'un transfert de gène directement *in vivo* selon la première approche envisagée ci-dessus, elles peuvent être utilisées sous forme :

. libre, c'est à dire transférées sous forme d'ADN nu, comme un plasmide ou un fragment de restriction, notamment par injection *in vivo* dans les cellules, comme décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 90 11 092;

. complexée ou associée à d'autres molécules favorisant leur entrée dans les cellules eucaryotes comme la lipofectin, le transfectace, le transfectam, la polyéthylènimine, etc ...;

. incorporée dans un vecteur viral, lequel sera introduit directement *in vivo* dans les cellules de l'organe ou du tissu cible par infection.

- Dans le cas d'un transfert de gène selon la seconde approche envisagée précédemment, dite *ex vivo*, la séquence d'ADN est intégrée *in vitro* dans des cellules qui sont ensuite introduites dans l'organisme du sujet; il peut s'agir alors par exemple de cellules souches hématopoïétique, de lymphocytes T, d'hépatocytes etc... Dans ce cas, les cellules génétiquement modifiées *in vitro* par la séquence d'ADN, selon les techniques décrites ci-dessus pour une introduction directement *in vivo*, peuvent avoir été prélevées du sujet traité ou provenir d'un autre sujet humain ou animal comme le porc (E. Cozzi et D. J. G. White, Nature Genetics, 1, 964-966, 1995).

Parmi, les substances capables d'interférer avec une pathologie et que l'on cherche à produire dans l'organisme du patient pour une thérapie génique, on peut citer certains antigènes ou anticorps.

L'expression de séquences d'ADN codant pour des protéines antigéniques vise à permettre la production, par les cellules génétiquement modifiées par cet ADN, d'antigène susceptibles d'induire une immunisation de l'individu. Une telle stratégie de vaccination a par exemple été mise en oeuvre dans le cas

de divers pathogènes dont le virus de la grippe (Tang, D., De Vit, M., et Johnston, Nature, 356, 152-154, 1992).

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps tels que des anticorps chimériques, par génie génétique dans des cellules eucaryotes a également déjà été décrite, par exemple dans les brevets européens publiés sous les numéros 120 694 et 125 023. L'injection à des patients d'anticorps thérapeutiques vise à cibler des antigènes impliqués dans une pathologie afin de neutraliser soit directement, soit par le biais d'une cascade d'événements métaboliques ou immunitaires, l'un des agents causals de la maladie. On peut citer comme exemples de telles stratégies thérapeutiques, le traitement ou la prévention de lymphomes B (Yefenof, E., Picker, L. I., Scheuermann, R. N., Vitetta, E. S., Street, N. E., Tucker, T., Uhr, J. W., Current Opinion in Immunology, 5, 740-744, 1993).

La demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 94 29 446 décrit l'expression intracellulaire de séquences d'ADN codant pour des anticorps. Cette approche permet d'envisager une thérapie génique directement *in vivo* de pathologie impliquant des composants cellulaires non accessibles par les méthodes de vaccination traditionnelles ou fondée sur la production *in vivo* d'antigènes recombinants. Les séquences d'ADN exprimées par les cellules génétiquement modifiées selon la méthode décrite dans la demande de brevet internationale WO 94 29 446 sont donc essentiellement caractérisées par le fait qu'elles comprennent un gène d'anticorps modifié de façon à ce que l'anticorps ne soit pas sécrété.

La présente invention vise au contraire à réaliser l'expression *in vivo* de gènes d'anticorps par

des cellules qui sécréteront lesdits anticorps dans la circulation sanguine du mammifère porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène d'anticorps.

5 Cette invention est fondée sur la mise en évidence que divers types cellulaires, autres que ceux produisant naturellement des anticorps sont capables, après modification génétique, de produire de manière stable *in vivo* des anticorps.

10 En effet, les plasmocytes, qui sont les cellules spécialisées pour la production d'anticorps, constituent de mauvais candidats pour la production à long terme d'anticorps thérapeutiques par transfert de gènes; les plasmocytes ont une durée de vie réduite, de l'ordre de quelques jours, et le fait qu'ils produisent
15 déjà un autre anticorps est de nature à conduire à des associations ou des recombinaisons entre les chaînes de l'anticorps naturellement produit et l'anticorps exprimé par le gène transféré, ce qui est hautement préjudiciable à l'effet thérapeutique recherché. Il
20 était donc important de montrer que des types cellulaires non spécialisés pour la production naturelle d'anticorps étaient susceptibles d'accepter un transfert de gène, d'exprimer *in vivo* un anticorps thérapeutique et de sécréter des niveaux soutenus avantageusement
25 régulés d'anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère.

En conséquence, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un
30 mammifère par transfert de gène, comprenant :

- soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène thérapeutique et se présentant sous une forme permettant le transfert *in vivo* dudit gène dans des cellules de mammifère,

- soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, et se présentant sous une forme permettant son implantation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable,

ledit matériel biologique étant caractérisé par le fait que ladite séquence d'acide nucléique contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps.

Par séquence d'acides nucléiques, on entend aussi bien des séquences d'ADN ou d'ARN ou des séquences contenant des nucléotides modifiés.

La séquence d'acides nucléiques entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention comprend :

- au moins un gène d'anticorps thérapeutique, c'est à dire un gène codant pour un anticorps natif non modifié donc naturel, ou un fragment d'anticorps, tels que les fragments Fab ou F(ab)'₂ ou les fragments ScFv, ou encore un dérivé d'anticorps comme un anticorps chimérique ou un anticorps ou fragment d'anticorps fusionné à une substance effectrice par exemple une toxine ou une hormone;

- au moins un élément assurant l'expression du gène précédent; il s'agit de séquences promotrices de la transcription placées en amont du gène d'anticorps et

contrôlant son expression dans les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps.

5 Outre le gène d'anticorps et son promoteur, la séquence d'acides nucléiques peut comprendre une séquence de terminaison de la transcription, située en aval du gène d'anticorps et permettant la sécrétion du produit du gène d'anticorps dans la circulation sanguine du mammifère dont des cellules ont été génétiquement modifiées par la séquence d'acides nucléiques.

10 Le promoteur utilisé peut être tout promoteur permettant une expression efficace du gène qu'il contrôle dans le type cellulaire génétiquement modifié par la séquence d'acides nucléiques. Il peut ainsi être un promoteur viral, un promoteur ubiquitaire
15 ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique.

 Selon une première forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des
20 éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par
25 ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se présentant sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue. On entend plus particulièrement par séquence d'ADN nu un plasmide, mais il peut aussi s'agir de tout autre
30 forme d'ADN tel qu'un fragment de restriction. Une composition pharmaceutique à base de ce matériel biologique peut être administrée à un individu par injection ou électroporation localisée; elle contient alors outre, la ou les séquences d'acide nucléique du
35 matériel biologique, un véhicule ou adjuvant

pharmaceutiquement acceptable et compatible avec des acides nucléiques.

5 Selon une deuxième forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des
10 cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence étant complexée ou conjuguée à une molécule ou substance porteuse favorisant sa pénétration dans les cellules
15 cibles, comme des liposomes ou des vésicules lipidiques.

Selon une troisième forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des
20 cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se présentant sous la forme d'un vecteur de transfert. Le vecteur dans lequel est incorporé le gène d'anticorps peut être un vecteur viral biologique, comme un
25 rétrovirus, un adénovirus, un parvovirus ou tout autre vecteur permettant le transfert efficace *in vivo* du gène d'anticorps dans les cellules d'un mammifère. Une composition pharmaceutique à base de ce matériel biologique peut être administrée à un individu soit
30 localement soit par voie systémique selon les méthodes
35

classiques de transfert de gène, par transfection d'ADN ou d'ARN ou infection par un virus.

Un quatrième mode de réalisation de l'invention relève d'une stratégie de transfert de gène par thérapie cellulaire mettant en oeuvre des cellules génétiquement modifiées. Dans ce mode de réalisation, le matériel biologique de l'invention est constitué de cellules ne produisent pas naturellement des anticorps, et se présentant sous une forme permettant leur incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, lesdites cellules étant génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

Le mode de réalisation précédent peut être mis en oeuvre selon deux variantes :

- Soit, les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention proviennent du mammifère à traiter. Dans cette variante, les cellules sont préparées par les techniques consacrées de la biologie cellulaire et moléculaire, comme par exemple, à partir de biopsies prélevées du patient à traiter, puis ces cellules sont modifiées génétiquement par la séquence d'acide nucléique portant le gène d'anticorps, soit par transfection soit par infection par un vecteur conforme à ceux décrits précédemment dans le cas d'un transfert de gène directement *in vivo*. Les compositions pharmaceutiques fabriquées à partir de ce matériel biologique sont administrées en retour au patient dont les cellules ont été prélevées.

- Soit, les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention proviennent d'un autre mammifère humain ou animal que celui à traiter.

5 Ces cellules ont été préparées comme dans la variante précédente. Dans le cas de cellules d'origine humaine, celles-ci proviennent de donneurs compatibles; dans le cas de cellules d'origine non-humaine, on utilise des cellules d'animaux génétiquement modifiées, comme le

10 porc, rendues compatibles pour une greffe d'organe.

Les cellules précédentes se présentent sous une forme permettant leur implantation par tout moyen connu dans l'organisme du mammifère receveur. Elles peuvent en outre se présenter sous une forme ayant

15 permis de les cultiver préalablement à la greffe. Il peut s'agir de tout support ou milieu de culture compatible avec leur administration et leur incorporation chez le receveur, comme par exemple une matrice du type de celle décrite dans la demande de brevet européen

20 publiée sous le numéro 378 576 concernant des fibroblastes.

Dans le quatrième mode de réalisation, mais aussi pour la préparation des acide nucléiques entrant

25 dans la composition des matériels biologiques des autres mode de réalisation de l'invention, on choisi des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps mais possédant :

- la capacité de pouvoir sécréter des

30 protéines dans la circulation sanguine d'un mammifère;

- une longue durée de vie dans l'organisme du mammifère, avantageusement d'au moins plusieurs mois à plusieurs années jusqu'à la vie entière du patient.

Plus particulièrement pour le quatrième mode

35 de réalisation de l'invention, ces cellules sont

choisies pour leur capacité à accepter facilement d'être prélevées, modifiées génétiquement *ex vivo* et implantées chez un mammifère.

5 Parmi les type cellulaires présentant les caractéristiques précédentes, l'invention envisage plus spécifiquement les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques.

10 Il a été démontré de manière surprenante (Fenjves, E. S., Smith, J., Zaradic, S., et Teichman, L. B., Human Gene Therapy, 5, 1241-1248, 1994) que les kératinocytes pouvaient produire relativement efficacement des protéines vers l'organisme et non pas
15 seulement vers l'extérieur. En outre, leur culture est facile et en routine depuis plusieurs années dans les services hospitaliers pour les greffes de peau.

La manipulation des hépatocytes est plus difficile que celle des kératinocytes. Cependant, il a été montré (Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K.,
20 Stein, E. A., Engelhart, J. F., Müller, D., Lupien, P. J., Wilson, J. M., Nature Genetics, 6, 335-341, 1994 ; Ferry, N., Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O., Heard J-M., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 8377-8381, 1991) que les hépatocytes pouvaient être infectés par des
25 rétrovirus recombinants à la fois *ex vivo* et *in vivo*.

La culture et la transduction rétrovirale des fibroblastes de peau sont faciles (Moullier, P., Maréchal, V., Danos, O, Heard, J-M., Transplantation, 56, 427-432, 1993). La manipulation des organoïdes est
30 aisée (Moullier et al., Nature Genetics, 4, june 1993, 154-159). Les fibroblastes présentent l'avantage d'être facilement prélevable chez un sujet par une simple opération chirurgicale. En outre, des protocoles de thérapie génique sont en préparation pour la correction
35 de déficits lysosomiaux chez les enfants.

Les myoblastes qui sont des cellules musculaires non différenciées, peuvent aussi être purifiés, et seront vraisemblablement utilisés sans modification génétique dans le cadre du traitement de certaines maladies dégénératives (Yao, S-N., Smith, K. J., et Kurachi, K., Gene Therapy, 1, 99-107, 1994).

La modification génétique de cellules endothéliales a déjà été réalisée pour produire des protéines thérapeutiques, par exemple dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le numéro WO 90 06997. Les cellules endothéliales, qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, sont donc particulièrement adaptées à la mise en oeuvre du matériel biologique de l'invention, dont le but est de faire sécréter, par les cellules génétiquement modifiées, les anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère.

D'autres types cellulaires peuvent être envisagés, telles que les cellules souches hématopoïétiques, dès lors qu'ils remplissent les caractéristiques définies plus haut.

Le matériel biologique de l'invention trouve son application dans la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir les rechutes de cancers, et les infections ou expansions virales plus particulièrement le SIDA.

Le cancer touche environ une personne sur quatre dans les populations occidentales et les traitements disponibles aujourd'hui ne sont réellement satisfaisants que pour un patient sur deux.

Des maladies virales graves touchent de manière de plus en plus importante les populations humaines, on pense bien entendu plus particulièrement aux virus HIV, pour lequel on ne dispose à l'heure

actuelle d'aucun traitement efficace pour prévenir ou traiter l'infection.

Le matériel biologique de l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'envisager une nouvelle
5 approche thérapeutique de ces maladies très graves.

En effet, dans le cas des cancers, il permet à l'organisme de disposer sur le long terme d'anticorps spécifiques des cellules tumorales soit cytocides, soit induisant la dormance cellulaire. Ce but est atteint en
10 utilisant des séquences d'acide nucléique portant un gène codant pour des anticorps dirigés contre un antigène spécifique de cellules tumorales.

Dans le cas des infections virales, le matériel biologique de l'invention permet à l'organisme
15 de maintenir sur le long terme un niveau basal d'anticorps soit neutralisants pour les virus, soit cytocides pour les cellules infectées. Ce but est atteint en utilisant des séquences d'ADN codant pour des anticorps dirigés contre un antigène spécifique du virus
20 responsable de la dite infection ou contre un antigène spécifique des cellules infectées par ledit virus.

La présente invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que défini précédemment. Ces compositions
25 peuvent contenir outre le matériel biologique de l'invention, des véhicules ou adjuvants classiquement utilisés. Les doses de matériel biologique entrant dans ces compositions pharmaceutiques sont adaptées au mode d'administration utilisée, à la pathologie visée, de la
30 séquence d'acide nucléique mise en oeuvre et de sa forme de présentation, pour permettre la production et la sécrétion d'une quantité thérapeutiquement efficace de l'anticorps dans la circulation sanguine du sujet traité.

L'invention concerne aussi des cellules humaines ou non-humaines ne produisant pas naturellement des anticorps, mais génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps thérapeutique et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère ayant reçu lesdites cellules d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

Ces cellules constituent un matériel biologique particulièrement adapté pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à une thérapie cellulaire *ex vivo* d'un individu.

Les cellules humaines précédentes, dès lors qu'elles ne proviennent pas du patient chez lequel elles sont implantées, ou les cellules animales, sont bien entendu, préalablement à leur implantation, traitées par tous moyens physiques ou génétiques, connus de l'homme du métier, pour être protégées du système immunitaire du patient les recevant.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un matériel biologique ou de cellules de précédents, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales. L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas

naturellement des anticorps, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène. Plus particulièrement, cette utilisation vise la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement des cancers ou d'infections virales.

L'invention concerne enfin un procédé de fabrication d'une cellule génétiquement modifiée par au moins une séquence d'ADN codant pour un anticorps thérapeutique ou un fragment de cet anticorps, caractérisée en ce que l'on transfère par tout moyen approprié des séquences d'ADN codant pour un anticorps thérapeutique ou un fragment de cet anticorps, dans des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'ADN.

Outre les caractéristiques qui précèdent, l'invention comporte d'autres caractéristiques qui apparaîtront au cours de la description qui suit et qui se réfèrent à des exemples expérimentaux de réalisation et de mise en oeuvre de la présente invention, étant entendu que ces exemples ne sauraient constituer une quelconque limitation à la portée des revendications.

Les travaux rapportés ci-dessous ont permis de démontrer que :

- *in vitro* des cellules prélevables chez le patient, modifiables génétiquement ~~ex vivo~~ et réimplantables, qui ne produisent pas naturellement des anticorps, sont capables de sécréter des anticorps recombinants conservant les propriétés de l'anticorps d'origine,

- au moins un type cellulaire précédent est capable de sécréter *in vivo* des anticorps recombinants conservant les propriétés de l'anticorps d'origine.

5

I - Définition de l'anticorps recombinant.

10

L'anticorps recombinant modèle utilisé pour les expériences de transfert de gène d'anticorps rapportées ci-après est un anticorps monoclonal de souris anti-thyroglobuline humaine (Tg10) (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Son clonage moléculaire et la caractérisation fonctionnelle des ADN complémentaires de sa chaîne lourde et de sa chaîne légère ont été effectués comme indiqué ci-après.

15

20

25

30

35

La thyroglobuline est une glycoprotéine iodée de haut poids moléculaire impliquée dans la synthèse, le stockage et la sécrétion des hormones thyroïdiques T3 et T4 (Marriq, C., C. Arnaud, M. Rolland, and S. Lissitzky. 1980. Eur. J. Biochem. 111:3347). Un anticorps monoclonal de souris, désigné ci-après Tg10, dirigé contre une région antigénique (région II) fréquemment reconnu par des autoanticorps naturels chez les patients atteints de maladie de Grave, de la thyroïdite de Hashimoto et des carcinomes de la thyroïde, a été établi par des membres du laboratoire CNRS UMR 9921 de la Faculté de pharmacie de Montpellier, Avenue Charles Flahaut, 34060, Montpellier Cedex 01, France (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Les ADN complémentaires des chaînes légères (Kappa) et lourde (IgG1) de l'anticorps Tg10 ont été clonés dans le vecteur pSPORT1 (Gibco/BRL) par les techniques consacrées du génir génétique (Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Les séquences nucléotidiques des parties variables des chaînes lourdes et légères qui spécifient chacune des chaînes d'anticorps ont été déterminées et sont représentées respectivement aux figures 1 et 2 en annexe. Le clonage et le séquençage des ADNc de l'anticorps Tg10 ont été effectués au laboratoire sus-mentionné.

Pour leur caractérisation fonctionnelle, les ADNc de la chaîne légère et de la chaîne lourde de l'anticorps Tg10 ont été clonés dans le vecteur rétroviral pLXPXSN (Morgan, R. A., L. Couture, O. Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, and W. F. Anderson. 1992. Nucl. Acids Res 20:1293-1299) soit de part et d'autre de la séquence IRES du poliovirus endogène à ce vecteur pour former les vecteurs PM130, soit individuellement en amont de la séquence IRES pour former les vecteurs PM117 et PM124, comme représenté à la figure 3 en annexe). Les cellules simiennes COS-7 (ATCC CRL 1651) ont ensuite été transfectées par la technique au phosphate de calcium soit par PM130 seul, soit par la combinaison PM117+PM124. La présence dans les surnageants de culture d'anticorps réactifs contre la thyroglobuline humaine a été testée par la technique ELISA (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). En outre, les constantes cinétiques d'association et de dissociation de l'anticorps recombinant Tg10 produit par les cellules COS-7 avec la thyroglobuline ont été déterminées à partir des surnageants de culture par résonance plasmonique de surface (Fagerstam, L. G., and R. Karlsson. 1993. Biosensor techniques. In Immunochemistry, V. Oss and M. vanRegenmortel, eds. M Dekker Inc. p.949-970) suivant la technique Biacore développée par la société Pharmaci Biosensor.

Les valeur de ces constantes sont rapportées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Anticorps	Constante cinétique d'association k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	Constante cinétique de dissociation k_{off} (s^{-1})	Constante d'affinité K_a
Anticorps Tg10 naturel	$4,6 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,3 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \pm 0,4 \times 10^9$
Anticorps Tg10 recombinant (PM117+PM124)	$1,4 \pm 0,3 \times 10^5$	$4,3 \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$3,2 \pm 1,4 \times 10^9$
Anticorps Tg10 recombinant (PM130)	$2,1 \pm 1,5 \times 10^5$	$6,0 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	$3,5 \pm 2,7 \times 10^9$
Chaîne lourde de l'anticorps Tg10 recombinant (PM117+PM124)	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \pm 1,2 \times 10^8$

5

De façon surprenante, le tableau 1 montre que la chaîne lourde synthétisée seule à partir de PM124 est sécrétée par les cellules COS-7 et reconnaît la thyroglobuline humaine avec une affinité diminuée seulement de 10 fois par rapport à l'anticorps complet.

10

II - Lignées productrices de rétrovirus.

15

La plupart des cellules primaires sont extrêmement sensibles aux méthodes de transfection classiques. En outre, la durée de vie, et donc l'expression, de l'ADN transfecté est en général très courte dans la plupart des cellules transfectées.

20

Pour permettre une infection efficace de types cellulaires variés et une expression sur le long terme de l'anticorps Tg10 dans les cellules génétiquement modifiées, une lignée cellulaire productrice de rétrovirus recombinants véhiculant et exprimant les ADNc de l'anticorps Tg10 a été établie.

Les cellules d'empaquetage rétroviral amphotrope PA 317 (Miller, D. and Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) ont été transfectées par la technique du précipité au phosphate de calcium par le vecteur rétroviral PM130. Plusieurs clones producteurs stables ont été établis. La lignée PA130.10 a été utilisée pour les expériences d'infection ultérieures. Son titre en virus, dosé sur la lignée indicatrice NIH 3T3 (Miller, D. and Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) a été de 10^4 cfu/ml.

III - Expériences in vitro.

Les rétrovirus produits par la lignée PA130.10 ont été utilisés pour infecter différentes lignées cellulaires établies représentatives de différents types cellulaires disponibles auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) :

- lignée NIH3T3 de fibroblastes murins;
- lignée A431 de kératinocytes humains;
- lignée HepG2 d'hépatocytes humains;
- lignée C2C12 de myoblastes.

Différents clones cellulaires ont été dérivés pour chaque type de transduction rétrovirale et l'anticorps Tg10 produit dans le surnageant de culture a été dosé par ELISA. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

Lignées	Anticorps Tg10
Lignée NIH3T3	88 +/- 65 ng / 10^5 cellules / 24hrs
Lignée A431	35 +/- 6 ng / 10^5 cellules / 24hrs
Lignée HepG2	3,5 +/- 1,5 ng / 10^5 cellules / 24hrs
Lignée C2C12	2 +/- 0,6 ng / 10^5 cellules / 24hrs

En outre, dans le cas des myoblastes C2C12 différenciés in vitro en myotubes la production est conservée.

5 Les propriétés thermodynamiques et cinétiques des anticorps produits par ces différents types cellulaires déterminées par résonance plasmonique de surface selon la technologie BIAcore (Pharmacia Biosensor) se sont révélées être identiques à celles de l'anticorps Tg10 de départ.

10 Les vecteurs rétroviraux ont dans un second temps été utilisés pour infecter des fibroblastes primaires de peau de souris (infection rétrovirale et des hépatocytes humains (transfection). Les productions en anticorps ont été respectivement de :

- 15 - 10 à 20 ng / 10^5 cellules / 3 jours, et de
- 1 à 10 ng / 10^5 cellules / 4 jours.

De même, les caractéristiques des anticorps produits ont été les mêmes que celles de l'anticorps de départ.

20

IV - Expérience in vivo.

Des cellules C2C12 modifiées génétiquement et qui ont conservé la capacité de se différencier en myotubes ont été implantées par injection dans les jambiers antérieurs de 4 souris syngéniques C3H à raison de 10^7 cellules par jambier.

25 Chez 3 des 4 souris, la production d'anticorps recombinants ayant conservé les propriétés thermodynamique et la propriété de reconnaissance de l'antigène de l'anticorps de départ a été suivie pendant deux mois. La quantité d'anticorps produite s'est régulièrement élevée du niveau de base à une production d'environ 100 ng/ml de sérum.

30
35

REVENDICATIONS.

1) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, comprenant, soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène thérapeutique et se présentant sous une forme permettant le transfert *in vivo* dudit gène dans des cellules de mammifère, soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, et se présentant sous une forme permettant son incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable, caractérisé en ce que ladite séquence d'acides nucléiques contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps.

2) Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se

présentant sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue.

5 3) Matériel biologique selon la
revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une
séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps
et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine
10 de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par
ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas
naturellement des anticorps, ladite séquence étant
complexée ou conjuguée à une molécule ou substance
15 porteuse.

20 4) Matériel biologique selon la
revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une
séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps
et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine
d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace
de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par
25 ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas
naturellement des anticorps, ladite séquence étant un
vecteur permettant le transfert efficace *in vivo* du gène
d'anticorps dans des cellules.

30 5) Matériel biologique selon la
revendication 4, caractérisé en ce que le vecteur est un
vecteur viral biologique.

35 6) Matériel biologique selon la
revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué

de cellules ne produisent pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, lesdites cellules étant
5 génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace
10 de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

7) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, selon la revendication
15 6, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps proviennent du mammifère à traiter.

8) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, selon la revendication
20 6, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps proviennent d'un autre mammifère que celui à traiter et ont subi un traitement les rendant compatibles.
25

9) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement
30 des anticorps sont choisies parmi celles possédant :

- la capacité de pouvoir sécréter des protéines dans la circulation sanguine d'un mammifère;
- une longue durée de vie dans l'organisme d'un mammifère.

10) Matériel biologique selon la revendication 9, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi celles acceptant facilement d'être prélevées, modifiées génétiquement ex vivo et implantées chez un mammifère.

11) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques.

12) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gène d'anticorps est un gène codant pour un anticorps natif, un fragment ou un dérivé de cet anticorps tel qu'un anticorps chimérique.

13) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir un cancer chez un sujet, selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps est dirigé contre un antigène spécifique de cellules tumorales.

14) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir une infection ou une expansion virale chez un sujet, selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit anticorps fragment ou dérivé d'anticorps est dirigé contre un antigène spécifique du virus

responsable de la dite infection ou contre un antigène spécifique des cellules infectées par ledit virus.

5 15) Composition pharmaceutique comprenant un matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 avantageusement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 16) Cellule humaine ou non ne produisant pas naturellement des anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps thérapeutique et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la
15 circulation sanguine d'un mammifère ayant reçu lesdites cellules d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

20 17) Utilisation d'un matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou de cellules selon la revendication 16, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales.

25 18) Utilisation d'une séquence d'acide nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet
30 anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un
35 mammifère par transfert de gène.

19) Utilisation selon la revendication 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales.

5

20) Procédé de fabrication d'une cellule selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'on transfère par tout moyen approprié au moins une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps dans des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide nucléique.

10

15

20

PL. 1/3

Fig. 1

ATG GGT TGG CTG TGG AAC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GGA CAG
 M G W L W N L L F L M A A A Q S A Q G Q
 -20 -10 -1 1

ATC CAC TTG GTA CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC
 I H L V Q S G P E L K K P G E T V K I S
 10 20

TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA TCG TAT GGC TTG ACC TGG GTG ATA CAG TCT CCA
 C K A S G Y T F T S Y G L T W V I Q S P
 30 40

GGA AAG GAT TTA AAA TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TTC TCT GGA GTG CCA ACA TAT GCT
 G K D L K W M G W I N T F S G V P T Y A
 50 52 52A 60

GAT GAC TTC AAG GGA CGC TTT GCC TTC TCT TTG GAC ACC TCT ACC AGC ACT GCC TAT TTG
 D D F K G R F A F S L D T S T S T A Y L
 70 80

CAG ATC GAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT TCA AGA AGG GGG GGT
 Q I D N L K N E D T A T Y F C S R R G G
 82 82A 82B 82C 90 94

TTT ATT ACT ACG GCT CTT GAC ACC TGG GGC CAA GGC ACC TCT CTC ACA GTC TCC TCA GCC
 F I T T A L D T W G Q G T S L T V S S A
 100 110 113

PL. 2/3

Fig. 2

ATG	AAG	TTG	CCT	GGT	AGG	CTG	TTG	GTG	CTG	ATG	TTC	TGG	ATT	CCT	GCT	TCC	AAT	AGT	AAT
M	K	L	P	G	R	L	L	V	L	M	F	W	I	P	A	S	N	S	N
-19										-10								-1	1

GTT	GTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	TCT	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC
V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	S	V	S	L	G	D	Q	A	S	I
									10									20	

TCT	TGC	AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	ATT	GTA	CAT	AGT	AAT	GGA	AAC	ACC	TAT	TTA	GAA	TGG	TAC
S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y
						27	27A	27B	27C	27D	27E								

CTG	CAG	AAA	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTC	CTG	ATC	TAT	AAA	GTT	TCC	AAC	CGA	TTG	TCT
L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	L	S
				40															50

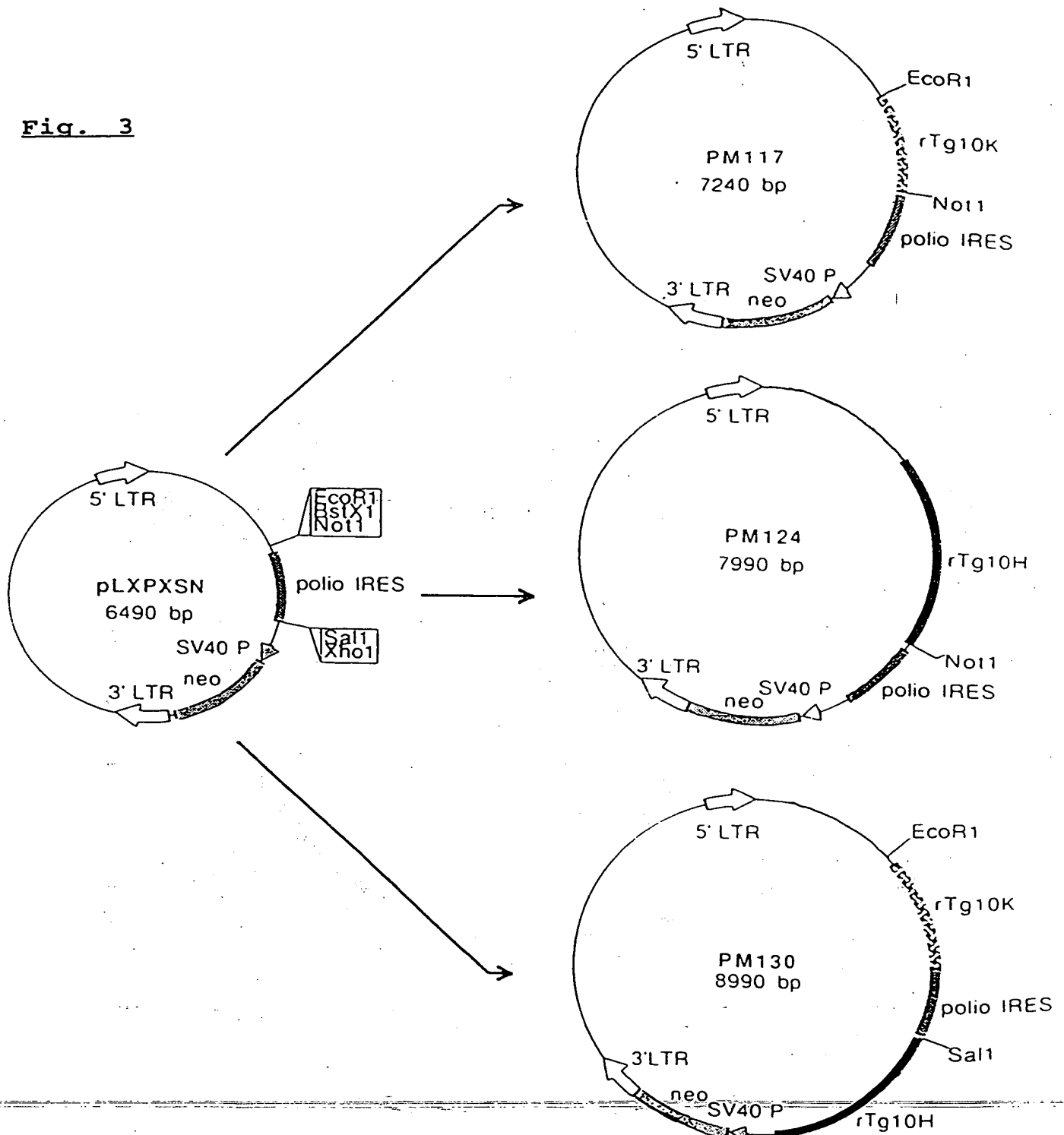
GGG	GTC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAC	TTC	ACA	CTC	AAA	ATC	AGC
G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S
																			60

AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	CTG	GGA	CTT	TAT	TAC	TGT	TTT	CAA	GGT	TCA	CAT	ATT	CCA	TTC
R	V	E	A	E	D	L	G	L	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	I	P	F
																			80

ACG	TTC	GGT	TCG	GGG	ACA	AAG	TTC	GAA	ATA	AAA	CGG	GCT	GAT	GCT	GCA	CCA	ACT	GTA	TCC
T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	R	A	D	A	A	P	T	V	S
																			100

110

Fig. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)